PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C07D 493/04, 417/06, 277/24, A61K 31/425, C07F 7/08, C07D 493/08, A01N 43/78, 43/90 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) (C07D 493/08, 321:00, 313:00)

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 97/19086**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Mai 1997 (29.05.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05080

(22) Internationales Anmeldedatum: 18. November 1996 (18.11.96)

(30) Prioritätsdaten:
195 42 986.9 17. November 1995 (17.11.95) DE
196 39 456.2 25. September 1996 (25.09.96) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). KIFFE, Michael [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND USE

(54) Bezeichnung: EPOTHILONDERIVATE, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to epothilone derivatives and the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivate und deren Verwendung.

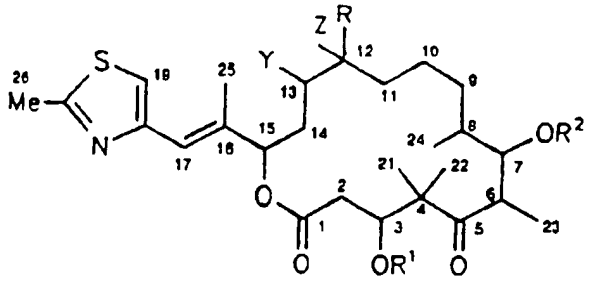
LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

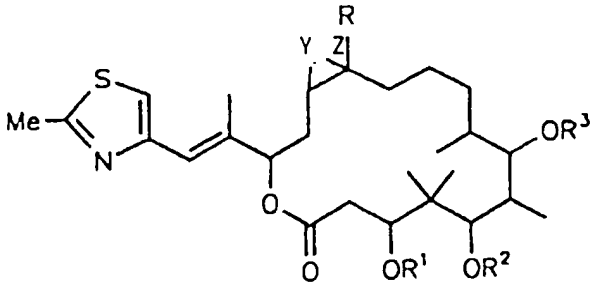
AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

EPOTHILONDERIVATE, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

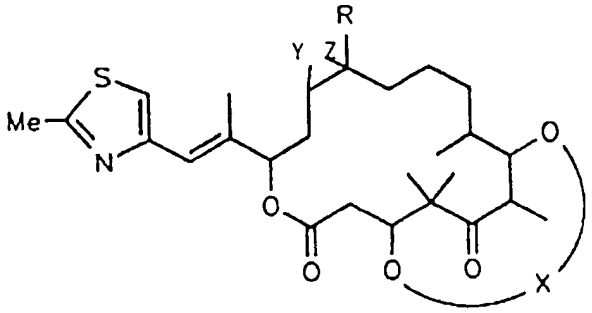
Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonderivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonderivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.



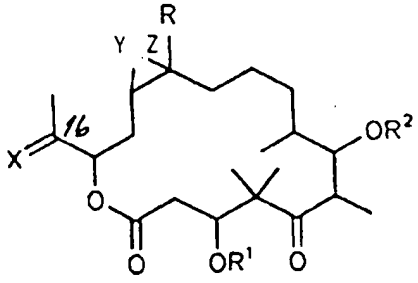
1



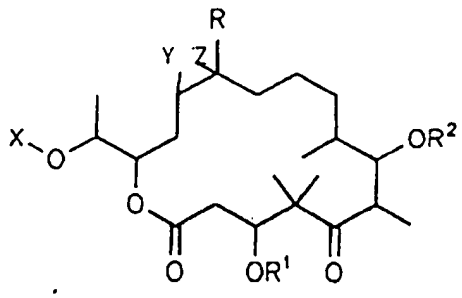
2



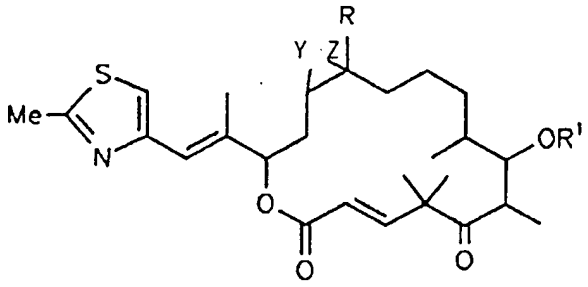
3



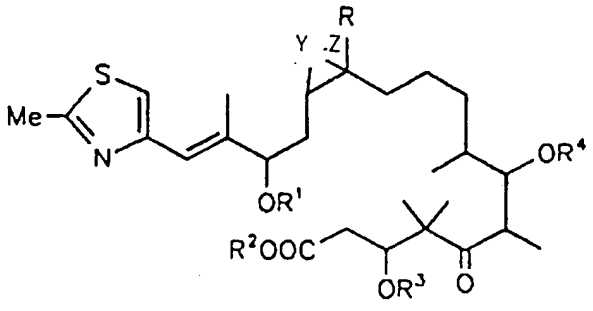
4



5



6



7

In den vorstehenden **Formeln 1 bis Formel 7** bedeuten:

R = H, C_{1-4}-Alkyl;
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-Alkyl,
C_{1-6}-Acyl-Benzoyl,
C_{1-4}-Trialkylsilyl,
Benzyl,
Phenyl,
C_{1-6}-Alkoxy-,
C_6-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;
wobei auch zwei der Reste R^1 bis R^5 zu der Gruppierung $-(CH_2)_n-$ mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;
Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl, Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder $-N_3$, OH, O-(C_{1-6})-Acyl, O-(C_{1-6})-Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden.

In der **Formel 3** steht X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, $-CR^1R^2-$, wobei R^1 und R^2 die Bedeutung haben wie oben angegeben, und $-SiR_2-$, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der **Formel 4** bedeutet X Sauerstoff, NOR^3, $N-NR^4R^5$, und $N-NHCONR^4R^5$, wobei die Reste R^3 bis R^5 die oben angegebene Bedeutung haben.

In der **Formel 5** bedeutet X Wasserstoff, C_{1-18}-Alkyl, C_{1-18}-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042. Verbindungen gemäß der allgemeinen **Formel 1** sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine X = Hal, Y = OH und Y = OH, Y = Hal erhält. Protonensäuren wie z.B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z.B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH_3/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen **Formel 2** sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z.B. mit $NaBH_4$ in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen **Formel 2** erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionellen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflaten ergeben Verbindungen der allgemeinen **Formel 3**. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen **Formel 3** entstehen durch Umacetalisierung z.B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen **Formel 4** werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z.B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fachmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrazone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinierung in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z.B. mit einem Aluminium- oder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen **Formel 5** erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z.B. bei O-Formyl durch NH_3/MeOH, bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen **Formel 6** werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z.B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z.B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen **Formel 7** werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z.B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen **Formel 7** aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch enzymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esterasen oder Lipasen. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

Ferner können Verbindungen der **Formel 7** durch Lactonisierung nach den Methoden von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Caesiumcarbonat) in Verbindung der **Formel 2** umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann man auch von Epothilon C oder D ausgehen, wobei zur Derivatisierung auf die vorstehend beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann. Dabei kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin; oder epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure; oder in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1:
Verbindung 1a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50 µl (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 4 mg (19 %) Isomer I
4 mg (19 %) Isomer II

Isomer I

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1}.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 $[M-H_2O]^+$), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für $[M-H_2O]^+$
gef.: 493.2478

Isomer II

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.22

IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm^{-1}.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für $[M-H_2O]^+$
gef.: 493.2475

Beispiel 2:
Verbindung 1b

55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.S ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 19 mg (32 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.46

IR (Film): ny = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M^+]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

Hochauflösung: $C_{26}H_{40}O_6ClNS$ ber.: 529.2265 für [M^+], gef.: 529.2280

Beispiel 3:
Verbindung 1c

25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151 µl (1.081 mmol) Triethylamin und 20 µl (0.517 mmol) 98 %-iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15 °C werden dem Reaktionsgemisch 40 µl (0.423 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 70 Minuten bei -15 °C gerührt. Nachdem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt, werden dem Reaktionsgemisch weitere 6 mg (0.047 mmol) Dimethylaminopyridin, 7 µl (0.047 mmol) Triethylamin, 2 µl 98 %-ige Ameisensäure (0.047 mmol) und 4 µl (0.047 mmol) Essigsäureanhydrid zugesetzt und 60 Minuten gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10). Ausbeute: 5 mg (18 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton. 90 : 10): 0.67

IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M^+]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

Hochauflösung: $C_{29}H_{40}O_9NSCl$ ber.: 613.2112 für [M^+]
gef.: 613.2131

Beispiel 4:
Verbindung 1d

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).
Ausbeute: 1 mg (9 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M^+]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: $C_{27}H_{42}O_6NSCl$ ber.: 543.2421 für [M^+]
gef.: 543.2405

Beispiel 5:
Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreagiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 - grad - nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: (20 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M^+]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

Hochauflösung: $C_{26}H_{41}O_6NS$ ber.: 495.2655 für [M^+]
gef.: 495.2623

Beispiel 6:
Verbindung 3a-d (a-d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50 µl (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a-d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Verbindung 3a

Ausbeute: 4 mg (12 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.50

IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs), 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s, Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch) cm^{-1}

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M^+]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ ber.: 539.2011 für [M^+]

Verbindung 3b

Ausbeute: 14 mg (13 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s), 1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M^+]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ ber.: 539.2011 für [M^+]
gef.: 539.1998

Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M^+]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ ber.: 539.2011 für [M^+]
gef.: 539.2001

Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M^+]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ ber.: 539.2011 für [M^+]
gef.: 539.1997

Beispiel 7:
Verbindung 4a

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70 °C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch

präparative Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M^+]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

Hochauflösung: $C_{21}H_{34}O_7$ ber.: 398.2305 für [M^+]
gef.: 398.2295

Beispiel 8:
Verbindung 6a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelost, mit 27 µl (0.180 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.
Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH_3/ml Methanol) versetzt und über

Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4 mg (22 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), 1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch), 1370 (m, SCh), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm^{-1}

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M^+]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_5NS$ ber.: 475.2392 für [M^+]
gef. 475.2384

Beispiel 9:
Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90 °C gerührt.
Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

Ausbeute: 7 mg (15 %)

Substanzcode
R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M^+]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

Hochauflösung: $C_{27}H_{37}O_6NS$ ber.: 503.2342 für [M^+]
gef.: 503.2303

Beispiel 10:
Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH_3/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt.
Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (67 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ny = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M^+]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: $C_{28}H_{39}O_6NS$ ber.: 517.2498 für [M^+]
gef.: 517 2492

Beispiel 11:
Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.
Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

Ausbeute: 11 mg (52 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M^+]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

Hochauflösung: $C_{23}H_{37}O_4NS$ ber.: 423.2443 für [M^+]
gef.: 423.2410

Beispiel 12:
Verbindung 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH_3/ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (59 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

IR (Film): ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm^{-1}

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M^+]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

Hochauflösung: $C_{29}H_{45}O_8NS$ ber.: 567.2866 für [M^+]
gef.: 567.2849

Beispiel 13:

50 mg Epothilon A werden in 20 µl Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7,1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30 °C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96 %).

Beispiel 14:

48 mg Epothilonsäure 7 werden in 6 ml THF abs. gelöst und unter Rühren mit 40 µl Triethylamin und 16 µl 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb von 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon A.

Beispiel 15:
Epothilone C und D als Ausgangsverbindungen

A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilon Basispatent.

B. Produktion mit DSM 6773

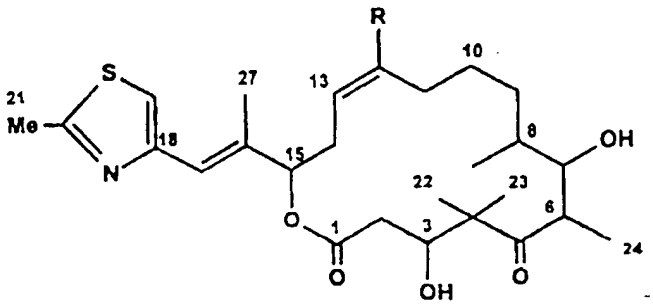
75 l Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 l Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Soyamehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 % $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.1 % $MgSO_4 \times 7H_2O$, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 2 m^3 Luft/h. Durch Regulierung der Drehzahl wird der pO_2 bei 30 % gehalten.

C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m^2, 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch Elution mit 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird. Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LH-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 µm, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min

Methanol/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit R_t = 90-95 min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute von jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

D. Physikalische Eigenschaften



Epothilon C R = H
Epothilon D R = CH_3

Epothilon C

$C_{26}H_{39}NO_5S$ [477]
ESI-MS: (positiv Ionen): 478.5 für $[M+H]^+$

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82
DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1
Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 11,5 min
Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35
Fluß: 1ml/min
Detection: Diodenarray

Epothilon D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]
ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für $[M+H]^+$

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82
DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1
Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 15,3 min
Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35
Fluß: 1ml/min
Detection: Diodenarray

Tabelle: ^1H-und ^{13}C-NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in $[D_6]$DMSO bei 300 MHz

	Epothilon C			Epothilon D		
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H_3	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H_3	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H_3	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H_3	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9
25-H_3	0.90			0.91	27	14.1
26-H_3				1.63		
27-H_3	2.10			2.11		

*, ** Zuordnung vertauschbar

Beispiel 15:
Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

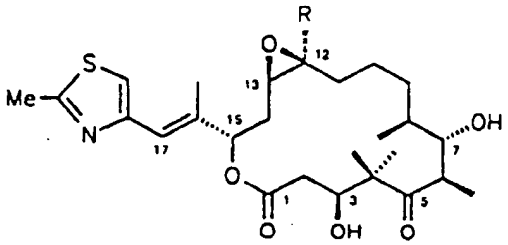
Ausbeute:

25 mg Epothilon A, R_t = 3,5 min (analyt. HPLC, 7 µm, Säule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min)

und

20 mg 12,13-Bisepi-epothilon A, R_t = 3.7 min, ESI-MS (pos. Ionen)

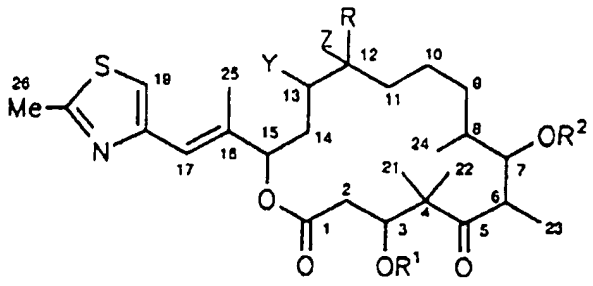
m/z = 494 $[M+H]^+$
^{1}H-NMR in [D_4] Methanol, ausgewählte Signale: delta = 4.32 (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-Bisepi-epothilon A R = H

Patentansprüche

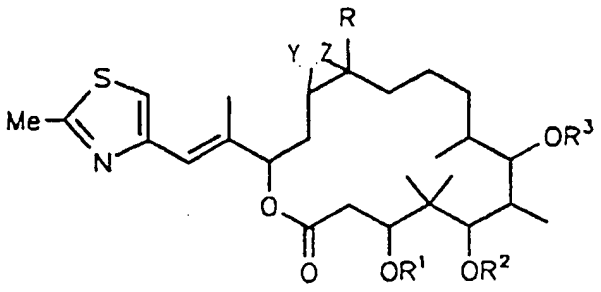
1. Epothilonderivat der Formel 1



1

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und Y und Z entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Wasserstoff, Halogen, Pseudohalogen, OH, O-(C_{1-6})-Acyl, O-(C_{1-6})-Alkyl oder O-Benzoyl stehen oder gemeinsam das O-Atom eines Epoxids oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden, wobei Epothilon A und B ausgenomen sind.

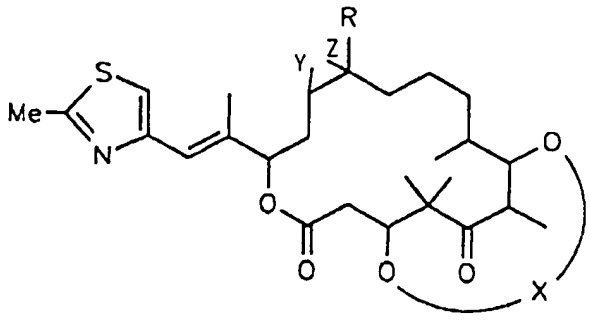
2. Epothilonderivat der Formel 2



2

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2, R^3 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

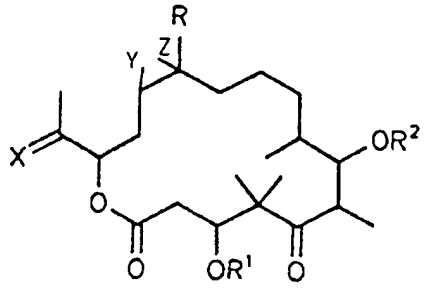
3. Epothilonderivat der Formel 3



3

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, $-CR^1R^2-$ und $-SiR_2-$ steht, wobei R, R^1 und R^2 die Bedeutung haben wie oben angegeben und R^1 und R^2 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

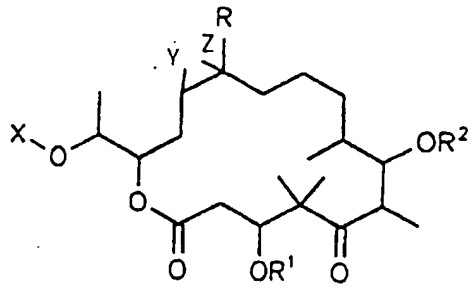
4. Epothilonderivat der Formel 4



4

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, X Sauerstoff, NOR^3, $N-NR^4R^5$, und $N-NHCONR^4R^5$ bedeutet, wobei die Reste R^3 bis R^5 die oben angegebene Bedeutung haben und R^4 und R^5 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und
Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

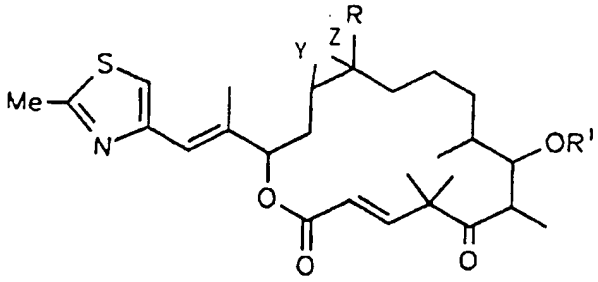
5. Epothilonderivat der Formel 5



5

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff, C_{1-18}-Alkyl, C_{1-18}-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet und
Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

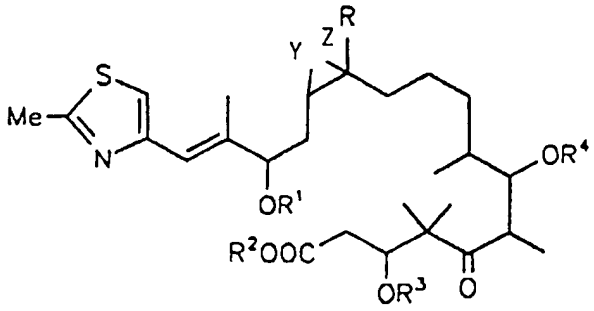
6. Epothilonderivat der Formel 6



6

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl und R^1 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl ist; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

7. Epothilonderivat der Formel 7



7

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl und R^1, R^2, R^3, R^4 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch ***gekennzeichnet***, daß man Epothilon A, Epothilon B, ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein 7-OH-geschütztes Derivat derselben

(a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit einer Esterase oder Lipase, oder
(b) in alkalischem Medium hydrolysiert, insbesondere mit Natriumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch,
und das Epothilonderivat der Formel 7 gewinnt und isoliert.

9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 2 gemäß Anspruch 2, dadurch *gekennzeichnet,* daß man ein Epothilonderivat der Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des Verfahrens gemäß Anspruch 8
(a) nach der Yamaguchi-Methode oder
(b) nach der Corey-Methode oder
(c) nach der Kellogg-Methode
in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.

10. Verfahren zur Herstellung von Epothilon A und/oder 12,13-Bisepi-epothilon A, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Epothilon C epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

11. Verfahren zur Herstellung von Epothilon B und/oder 12,13-Bisepi-epothilon B, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Epothilon D epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

12. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

13. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder

mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ɔnal Application No
PCT/EP 96/05080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07D493/04 C07D417/06 C07D277/24 A61K31/425 C07F7/08
C07D493/08 A01N43/78 A01N43/90 //(C07D493/04,313:00,
303:00),(C07D493/08,321:00,313:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07D C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISHE FORSCHUNG MBH)) 27 May 1993 see claims -----	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 February 1997	13. 02. 97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (- 31-70) 340-3016	Henry, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int[illegible]nal Application No
PCT/EP 96/05080

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9310121	27-05-93	DE-A-	4138042	27-05-93
		AU-A-	2943792	15-06-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int onales Aktenzeichen
PCT/EP 96/05080

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07D493/04 C07D417/06 C07D277/24 A61K31/425 C07F7/08
C07D493/08 A01N43/78 A01N43/90 //(C07D493/04,313:00,
303:00),(C07D493/08,321:00,313:00)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07D C07F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISHE FORSCHUNG MBH)) 27.Mai 1993 siehe Ansprüche -----	1-13

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
10.Februar 1997	13. 02. 97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (- 31-70) 340-3016	Henry, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlich. ...en, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte ...nales Aktenzeichen
PCT/EP 96/05080

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9310121	27-05-93	DE-A-	4138042	27-05-93
		AU-A-	2943792	15-06-93

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

PCT
[Logo]

International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification⁶: C07D 493/04, 417/06, 277/24, A61K 31/425, C07F 7/08, C07D 493/08, A01N 43/78, 43/90 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) (C07D 493/08, 321:00, 313:00)

A1

(11) International Publication Number: WO 97/19086

(43) International Publication Date: May 29, 1997 (29.05.97)

(21) International file No.: PCT/EP96/05080

(22) International application date: November 18, 1996 (18.11.96)

(30) Priority data:
195 42 986.9 November 17, 1995 (17.11.95) DE
195 39 456.2 September 25, 1996 (25.09.96) DE

(71) Applicant (*for all designated states other than US*):
GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (*only for US*):
Gerhard HÖFLE [DE/DE], Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).
Michael KIFFE [DE/DE], Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE)

(74) Attorneys: Hans D. BOETERS et al., Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 Munich (DE).

(81) Designated states: JP, US, European Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

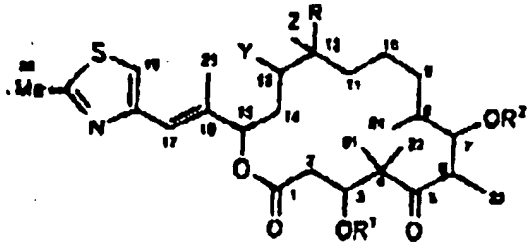
Published
With international search report.

(54) Title: EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND USE

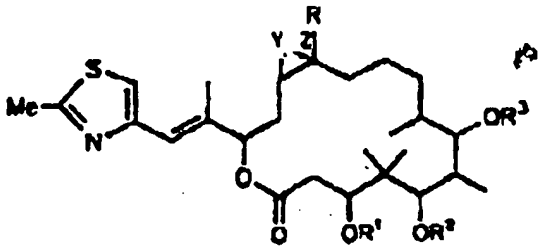
(57) Abstract:
The invention relates to epothilone derivatives and the use thereof.

EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND USE

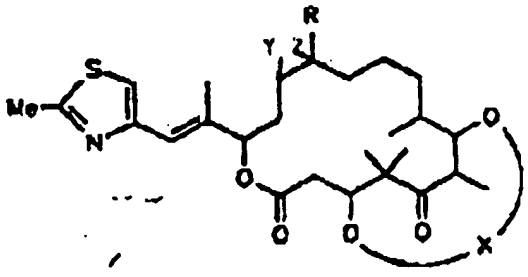
The present invention relates, in general, to epothilone derivatives and to their use for the preparation of drugs. In particular, the present invention relates to the preparation of the epothilone derivatives of the following general formulas 1 to 7, as well to their use in the preparation of therapeutic agents and agents for plant protection.



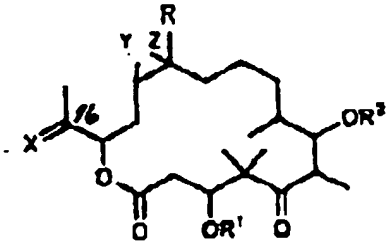
1



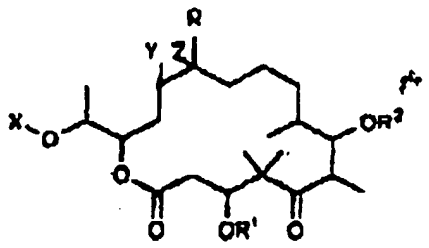
2



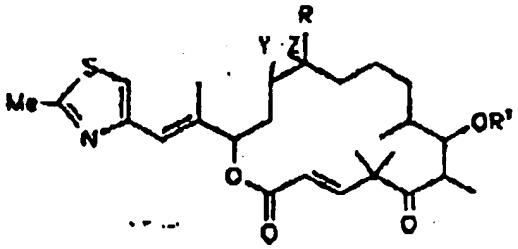
3



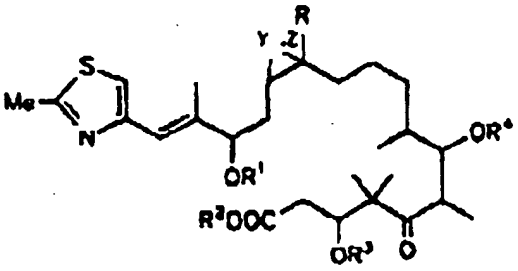
4



5



6



7

In the above formulas 1 to 7,

R = H, C_{1-4}-alkyl;
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-alkyl,
C_{1-6}-acyl-benzoyl
C_{1-4}-trialkylsilyl,
Benzyl,
Phenyl,
C_{1-6}-alkoxy,
C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl;

wherein two of the residues R^1 to R^5 can also join to form the group $-(CH_2)_n-$ with n = 1 to 6, and the alkyl or acyl groups contained in the residues are straight-chain or branched residues;
Y and Z are either the same or different and always stand for hydrogen, halogen such as F, Cl, Br or I, pseudohalogen such as -NCO, -NCS or $-N_3$, OH, O-(C_{1-6})-acyl, O-(C_{1-6})-alkyl, O-benzoyl. Y and Z can also stand for the O atom of an epoxide, where epothilone A and B are not claimed, or one of the C-C bonds form a C=C double bond.

In formula 3, X stands generally for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, CR^1R^2-, where R^1 and R^2 have the meaning indicated above, and $-SiR_2-$, where R has the meaning indicated above.

In formula 4, X represents oxygen, NOR^3, N-NR^4R^5, and N-$NHCONR^4R^5$, where the residues R^3 to R^5 have the above-indicated meaning.

In formula 5, X represents hydrogen, C_{1-18}-alkyl, C_{1-18}-acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl.

With regard to epothilone A and B, reference is made to DE-A-41 38 042. Compounds of the general formula 1 are accessible by starting from epothilone A and B as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by opening the 12,13-epoxide. If hydracids are added thereto, preferably in a nonaqueous solvent, then the halohydrins X = Hal, Y = OH, Y = Hal are obtained. Protonic acids such as toluenesulfonic acid and trifluoroacetic acid lead, in the presence of water, to 12,13-diols, which, by the use of standard methods, are subsequently acylated (e.g. with carboxylic acid anhydrides and pyridine or triethylamine/DMAP) or alkylated (alkyl halides and silver oxide). For this purpose the 3- and 7-hydroxy groups can temporarily be protected as formate (cleavage with NH_3/MeOH) or p-methoxybenzyl ether (cleavage with DDQ).

Compounds of general formula 2 are obtainable from epothilone A and B and from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by reduction, e.g. with $NaBH_4$ in methanol. If, in so doing, 3-OH and/or 7-OH are reversibly protected, then after acylation or alkylation and removal of the protecting groups 5-O-monosubstituted, 3,5- or 5,7,O-disubstituted derivatives of general formula 2 can be obtained.

Reactions of epothilone A and B with bifunctional electrophilic reagents such as (thio)phosgene, (thio)carbonyldimidazole, thionyl chloride or dialkylsilyl dichlorides or bistriflates give compounds of general formula 3. Acting as auxiliary bases in this case are pyridine, trialkylamines, optionally together with DMAP or 2,6-lutidine in a nonprotic solvent. The 3,7-acetals of general formula 3 result from reacetalization e.g. of dimethylacetals in the presence of an acid catalyst.

Compounds of general formula 4 are obtained from epothilone A and B or their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by ozonolysis and reductive work-up, e.g. with dimethyl sulfide. The C-16 ketones can then be converted into oxime, hydrazone or semicarbazone by standard methods that are familiar to persons skilled in the art. Furthermore, they are converted into C-16/C-17 olefins by olefination according to Wittig, Wittig-Horner, Julia or Petersen.

By reducing the C-16 keto group, e.g. with an aluminum or boron hydride, the 16-hydroxy derivatives of general formula 5 are obtainable. When 3-OH and 7-OH are provided with appropriate protecting groups, these derivatives can be selectively acylated or alkylated. The release of the 3-OH and 7-OH groups takes place e.g. in the case of O-formyl by means NH_3/MeOH, and in the case of O-p-methoxybenzyl by DDQ.

The compounds of general formula 6 are obtained from epothilone derivatives whose 7-OH group is protected with acyl or ether groups in that the 3-OH group is e.g. formylated, mesylated or tosylated and subsequently eliminated by treatment with a base, e.g. DBU. The 7-OH group can be released as described above.

Compounds of the general formula 7 can be obtained from epothilone A and B or their 3-OH and 7-OH-protected derivatives by basic hydrolysis, e.g. with NaOH in MeOH or MeOH/water. Preferably, compounds of the general formula 7 are obtained from epothilone A or B or their 3-OH or 7-OH-protected derivatives by enzymatic hydrolysis, particularly with esterases or lipases. After protection of the 19-OH group by alkylation, the carboxyl group can be converted into ester with diazoalkanes.

Furthermore, compounds of formula 7 can be converted into the compound of formula 2 by lactonization according to the methods of Yamaguchi (trichlorobenzoyl chloride/DMAP), Corey (Aldrithiol/triphenylphosphine) or Kellogg (omega-bromic acid/cesium carbonate. Pertinent working methods are can found in

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou, in J. Am. Chem. Soc. 96 (1974) 5614; and Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 5183.

To prepare the compounds of the invention it is possible to start out with epothilone C or D, in which case, for the derivatization, the above-described derivatization methods may be referred to. In this case the 12,13-double bond can be selectively hydrogenated, e.g. catalytically or with diimine; or epoxided, e.g. with dimethyldioxirane or a peracid; or be converted into the dihalides, dipseudohalides or diazides.

Moreover the invention relates to agents for protecting plants in agriculture, forestry and/or gardening, consisting of one or more of the above-mentioned epothilone derivatives, or consisting of one or more of the above-mentioned epothilone derivatives together with one or more conventional carriers and/or diluents.

Finally, the invention relates to therapeutic agents consisting of one of more of the above-mentioned compounds, or one or more of the above-mentioned compounds together with one or more conventional carriers and/or diluents. In particular, these agents may have cytotoxic activities and/or cause immunosuppression and/or be used for the control of

malignant tumors, in which case they can be used with particular preference as cytostatics.

Below, the invention will be explained and described in detail by the description of a few selected embodiments.

Examples

Example 1:
Compound 1a

20 mg (0.041 mmole) of epothilone A is dissolved in 1 ml of acetone, treated with 50 µl (0.649 mmole) of trifluoroacetic acid, and stirred overnight at 50°C. To work up the reaction mixture, it is treated with 1 M phosphate buffer pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from the solvent. The crude product is purified by means of preparative [thin] layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 4 mg (19%) Isomer I
4 mg (19%) Isomer II

Isomer I

R_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

IR (film): ny = 3440 (m, b, Sch); 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1}.

MS (20/70 V): m/e (%) = 493 (43 $[M-H_2O]^+$), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

High resolution: $C_{26}H_{39}O_6NS$ Calc.: 493.2498 for $(M-H_2O]^+$
Found: 493.2478

Isomer II

R_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.22

IR (film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w) cm^{-1}.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

High resolution: $C_{26}H_{39}O_6NS$ Calc.: 493.2498 for $[M-H_2O]^+$
Found: 493.2475

Example 2:
Compound 1b

55 mg (0.111 mmole) of epothilone A is dissolved in 0.5 ml of tetrahydrofuran, treated with 0.5 ml of 1 N hydrochloric acid and stirred at room temperature for 30 minutes. Thereupon it is treated with 1 N phosphate buffer pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from

the solvent. Th crude product is purified with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/-methanol, 90:10). Yield: 19 mg (32%).

R_f (dichloromethane/methanol, 90:10): 0.46

IR (film): ny = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1}.

UV (methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M$^+$]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

High resolution: $C_{26}H_{40}O_6ClNS$ Calc.: 529.2265 for [M$^+$].
Found: 529.2280

Example 3:
Compound 1c

25 mg (0.047 mmole) of 12-chloro-13-hydroxyepothilone A (1b) is dissolved in 1 ml of dichloromethane and treated with 29 mg (0.235 mmole) of dimethylaminopyridine, 151 µl (1.081 mmoles) of triethylamine and 20 µl (0.517 mmole) of 98% formic acid. The reaction mixture is cooled with ice/sodium chloride. After reaching -15°C, 40 µl (0.423 mmole) of acetic anhydride is added to the reaction mixture, and the latter is stirred for 70 minutes at -15°C. Since a thin-layer chromatogram shows no complete conversion, an additional 6 mg (0.047 mmole) of dimethylaminopyridine, 7 µl of triethylamine, 2 µl of 98% formic acid (0.047 mmole) and

4 µl (0.047 mmole) of ac tic anhydrid are added t the reaction mixture, and the latter is stirred for 60 minutes. To work up the reaction mixture it is heated to room temperature, treated with 1 M phosphate buffer pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from solvent. The crude product is purified by means of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/-acetone, 90:10). Yield: 5 mg (18%).

R_f (dichloromethane/acetone, 90:10): 0.67

IR (film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M^+]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

High resolution: $C_{29}H_{40}O_9NSCl$ Calc.: 613.2112 for [M^+]
Found: 613.2131

Example 4:
Compound 1d:

10 mg (0.020 mmole) of epothilone B is dissolved in 0.5 ml of tetrahydrofuran, treated with 0.5 ml of 1 N hydrochloric acid and stirred at room temperature for 30 minutes. Thereupon it is treated with 1 M phosphate buffer pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from

solvent. Th crude product is purified by means of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).
Yield: 1 mg (9%).

R_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

High resolution: $C_{27}H_{42}O_6NSCl$ Calc.: 543.2421 for [M⁺]
Found: 543.2405

Example 5:
Compound 2a

100 mg (0.203 mmole) of epothilone A is dissolved in 4 ml of tetrahydrofuran/1 M phosphate buffer pH 7 (1:1) and treated with sodium borohydride (150 mg = 3.965 mmoles) until the educt according to the thin-layer chromatogram shows that the reaction was completed. Thereupon the mixture is diluted with 1 M phosphate buffer pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from the solvent. The crude product is purified by silica chromatography (eluent: dichloromethane/acetone, 95:5 - grad - after dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 20%.

R_f (dichloromethane/acetone, 75:25): 0.27

IR (film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch),

1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M⁺]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16). 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

High resolution: $C_{26}H_{41}O_6NS$ Calc. 495.2655 for [M⁺]
Found: 495.2623

Example 6:
Compounds 3a-d (a-d are stereoisomers)

100 mg (0.203 mmole) of epothilone is dissolved in 3 ml of pyridine, treated with 50 µl (0.686 mmole) of thionyl chloride and stirred at room temperature for 15 minutes. Thereupon it is treated with 1 M phosphate buffer pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from the solvent. The crude product is purified and the four stereoisomers 3a-d are separated by means of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Compound 3a

Yield: 4 mg (12%)
R_f (toluene/methanol 90:10): 0.50
IR (film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs), 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s, Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch) cm^{-1}

UV (methan l): lambda$_{max}$ lg psilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M$^+$]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NHS_2$ Calc.: 539.2011 for [M$^+$]

Compound 3b

Yield: 14 mg (13%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.44

IR (film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s), 1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm^{-1}

UV (methanol): lambda$_{max}$ (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm

MS (20/70 eV): m/e % = 539 (27 [M$^+$]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ Calc.: 539.2011 for [M$^+$]
Found: 539.1998

Compound 3c

Yield: 4 mg (4%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M$^+$]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ Calc.: 539.2011 for [M$^+$])
Found: 539.2001

Compound 3d

Yield: 1 mg (1%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M$^+$]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ Calc.: 539.2011 for [M$^+$]
Found: 539.1997

Example 7:
Compound 4a

10 mg (0.020 mmole) of epothilone A is dissolved in 2 ml of dichloromethane, cooled to -70°C, and then treated with ozone for 5 minutes until a slight blue coloration develops. The resulting reaction mixture is then treated with 0.5 ml of dimethyl sulfide and heated to room temperature. To work up the reaction mixture it is freed from the solvent and then purified by preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5).

Yield: 5 mg (64%)

R_f (dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5): 0.61

IR (film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm^{-1}.

UV (methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M$^+$]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

High resolution: $C_{21}H_{34}O_7$ Calc.: 398.2305 for [M$^+$])
Found: 398.2295

Example 8:
Compound 6a

10 mg (0.018 mmole) of 3,7-di-O-formylepothilone A is dissolved in 1 ml of dichloromethane, treated with 27 µl (0.180 mmole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) and stirred at room temperature for 60 minutes. To work up the reaction mixture it is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer pH 4.5 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent. After removal of the solvent the resulting crude product is dissolved in 1 ml of methanol, treated with 200 µl of an ammoniacal methanol solution (2 mmoles NH_3/ml methanol) and stirred overnight at room temperature. For working up, the solvent is removed in vacuo.

Yield: 4 mg (22%).

R_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

IR (film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), 1717 (vs, sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch), 1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm^{-1}.

UV (methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M^+]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_5NS$ Calc.: 475.2392 for [M^+]
Found: 475.2384

Example 9:
Compound 6b

50 mg (0.091 mmole) of 3,7-di-O-formylepothilone A is dissolved in 1 ml of dichloroethane, treated with 2 ml (0.013 mole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), and stirred for 12 hours at 90°C.

To work up the reaction mixture, it is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer pH 4.5, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from the solvent.

The crud pr duct consisting of tw comp unds is purified by preparativ layer chr mat graphy (solvent: dichloromethane/-aceton , 90:10).

Yield: 7 mg (15%)

Substance code

R_f (dichloromethane/acetone, 90:10): 0.62

IR (film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm^{-1}.

UV (methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M$^+$]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

High resolution: $C_{27}H_{37}O_6NS$ Calc.: 503.2342 for [M$^+$])
Found: 503.2303

Example 10:
Compound 6c

5 mg (0.009 mmole) of 3,7--di-O-acetylepothilone is dissolved in 1 ml of methanol, treated with 150 µl of an ammoniacal methanol solution (2 mmoles NH_3/ml methanol) and stirred overnight at 50°C.

For working up, the solvent is eliminated in vacuo. The crude product is purified by means of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (67%).

R_f (dichloromethane/acetone 90:10): 0.55

IR (film): ny = 2954 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1}.

UV (methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M$^+$]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (65).

High resolution: $C_{27}H_{39}O_6NS$ Calc.: 517.2498 for [M$^+$]
Found: 517.2492

Example 11:
Compound 7a

20 mg (0.041 mmole) of epothilone is dissolved in 0.5 ml of methanol, treated with 0.5 ml of 1 N sodium hydroxide solution and stirred for 5 minutes at room temperature.

To work up the reaction mixture, it is treated with 1 M phosphate buffer pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent. The crude product is purified by means of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/methanol, 85:15).

Yield: 11 mg (52%).

R_f (dichloromethan /methanol, 85:15): 0.92

IR (film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm^{-1}.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M^+]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

High resolution: $C_{23}H_{37}O_4NS$ Calc. 423.2443 for [M^+]
Found: 423.2410

Example 12:
Compound 7b

5 mg (0.009 mmole) of 7-O-acetylepothilone is dissolved in 1 ml of methanol, treated with 200 µl of an ammoniacal methanol solution (2 mmoles NH_3/ml methanol), and stirred for two days at 50°C. For working up, the solvent is removed in vacuo. The crude product is purified by means of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (59%)

R_f (dichloromethane/methanol, 90:10): 0.63

IR (film): ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm^{-1}

UV (methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M^+]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65),

164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

High resolution: $C_{29}H_{45}O_8NS$ Calc.: 567.2866 for [M$^+$]
Found: 567. 2849

Example 13:

50 mg of epothilone A is dissolved in 20 µl of dimethyl sulfoxide and diluted with 30 ml of phosphate buffer (pH 7.1, 30 mM). After the addition of 5 mg of pig liver esterase (Boehringer Mannheim Co.) the mixture is stirred for 2 days at 30°C. It is acidified with 2 N HCl to pH 5 and the epothilone acid 7 is extracted with ethyl acetate. The organic phase is dried with sodium sulfate, and evaporated to dryness in vacuo. Yield 48 mg (96%).

Example 14:

48 mg of epothilone acid 7 is dissolved in 6 ml of abs. THF and treated with 40 µl of triethylamine and 16 µl of 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride while stirring. After 15 minutes the precipitate is filtered off, and [the filtrate] is dropwise added in 15 minutes to a boiling solution of 20 mg of 4-dimethylaminopyridine in 200 ml of abs. toluene while stirring rapidly. After an additional 10 minutes the mixture is evaporated in vacuo and the residue is distributed between ethyl acetate and citrate buffer (pH 4). After preparative HPLC separation, the evaporation residue of the organic phase yields 15 mg of epothilone A.

Example 15:
Epothil n C and D s starting compounds

A. Production strain and culturing conditions in accordance with the basic patent.

B. Production with DSM 6773

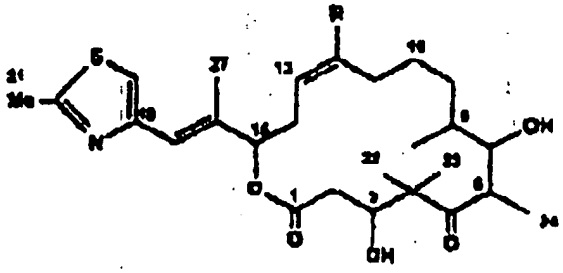
As described in the basic patent, 75 l of culture is grown and used to inoculate a production fermenter containing 700 l of production medium consisting of 0.8% starch, 0.2% glucose, 0.2% soybean flour, 0.2% yeast extract, 0.1% $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4, and optionally 15 l Amberlite XAD-16 adsorption resin. The fermentation lasts 7-10 days at 30°C, aerating with 2 m^3 air/h. By regulating the rpm the pO_2 is maintained at 30%.

C. Isolation

The adsorption resin is separated from the culture by means of an 0.7 m^2 100 mesh process filter and freed from polar impurities by washing with 3 bed volumes of water/methanol 2:1. By elution with 4 bed volumes of methanol a crude extract is obtained which is evaporated in vacuo until the water phase appears. The latter is extracted three times with an equal volume of ethyl acetate. Evaporation of the organic phase yields 240 g of crude extract, which is distributed between methanol and heptane in order to separate lipophilic impurities. From the methanol phase, evaporation in vacuo yields 180 g of refined product, which is fractionated in three portions over Sephadex LH-20 (column 20 x 100 cm, 20 ml/min methanol). The epothilones are contained in the total 72 g fraction eluted with 240-300 min retention time. To separate the epothilones they are chromatographed in three portions on Lichrosorb RP-18 (15 µm,

column 10 x 40 cm, eluent 180 ml/min of methanol/wat r 65:35). After epothilone A and B, pothilone C is luted with R_t = 90-95 min, and ep thil ne D with R_t ~ 100-110 min, and after evaporation in vacuo, they are each obtained as colorless oils in a yield of 0.3 g.

D. Physical properties



Epothilone C R = H
Epothilone D R = CH_3

Epothilone C

$C_{26}H_{39}NO_5S$ [477]
ESI-MS: (positive ions): 478.5 for $[M+H]^+$

For 1H and 13C see NMR table.

TLC: R_f = 0.82
DC Alufolie 60 F 254 Merok.
Solvent: Dichloromethane/methanol = 9:1.

Detection: UV extinction at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray coloration upon heating to 120°C.

HPLC: R_t = 11.5 min
Column: Nucleosil 100 C-18 7 µm, 125 x 4 mm
Eluent: Methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 ml/min
D tection: Diod array

Epothilone D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]
ESI-MS: (positive ions): 492.5 for $[M+H]^+$

For 1H and 13C see NMR table.

TLC: R_f = 0.82
DC Alufolie 60 F 254 Merck,
Solvent: Dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinction at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray coloration on heating to 120°C.

HPLC: R_t = 15.3 min.
Column: Nucleosil 100 C-18 7 µm, 125 x 4 mm
Eluent: Methanol/water = 65:35
Flow rate: 1 ml/min
Detection: Diode array.

Tabl : ^1H and ^{13}C NMR data f epothilone C and epothilone D in [D_6]DMSO at 300 MHz.

	Epothilon C			Epothilon D		
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	74.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.45	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	25.9
9-Ha	1.35	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.35*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H_3	2.65	23	22.8	2.65	23	22.5
22-H_3	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H_3	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H_3	1.06	27	14.3	1.07	26	22.9
25-H_3	0.90			0.91	27	14.1
26-H_3				1.63		
27-H_3	2.10			2.11		

*, ** Assignment interchangeable

Example 15:
Epothilone A and 12,13-bisepi- epothilone A from epothilone C

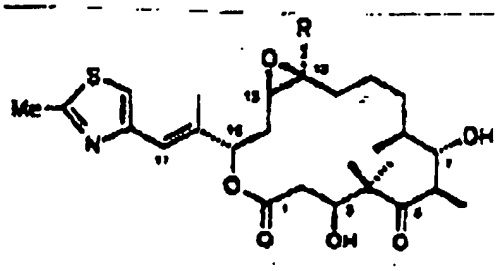
50 mg of epothilone A is dissolved in 1.5 ml of acetone and treated with 1.5 ml of a 0.07 molar solution of dimethyl-dioxirane in acetone. After standing for 6 hours at room temperature, the mixture is evaporated in vacuo and separated by preparative HPLC on silica gel (eluent: methyl tert.-butyl ether/petroleum ether/methanol 33:66:1).

Yield:
25 mg of epothilone A, R_t = 3.5 min (analyt. HPLC, 7 µm, column 4 x 250 mm, eluent: see above; flow rate 1.5 ml/min)

and

20 mg of 12, 13-bisepi-epothilone A, R_t = 3.7 min, ESI-MS (positive ions)

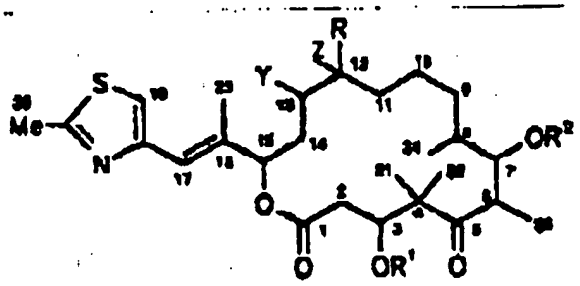
m/z = 494 $(M+H)^+$
^1H NMR in $[D_4]$ methanol, selected signals: delta = 4.32 (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-bisepi-epothilone A R = H

Claims

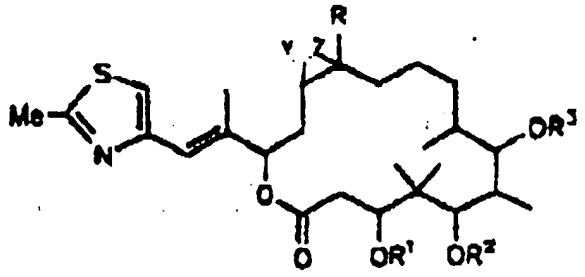
1. Ep thilone derivativ of formula I



1

wherein R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and the alkyl or acyl groups contained in the residues are straight-chain or branched residues, and Y and Z are either the same or different and each stands for hydrogen, halogen, pseudohalogen, OH, O-(C_{1-6})-acyl, O-(C_{1-6})-alkyl or O-benzoyl, or together form the O atom of an epoxide or one of the C-C bonds of a C=C double bond, with epothilone A and B being excepted.

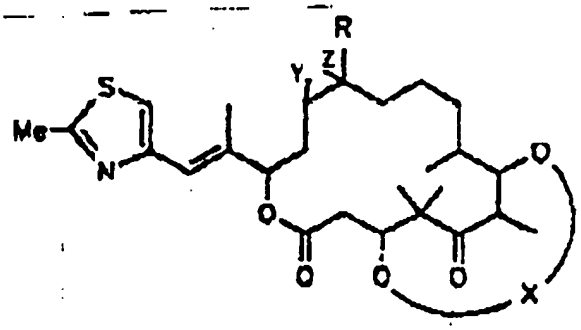
2. Epothilone derivative of the formula 2



2

wherein R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2, R^3 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl-, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy, C_5-alkyl, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl or acyl groups contained in the residues being straight-chain or branched residues; and Y and Z have the same meanings as in Claim 1.

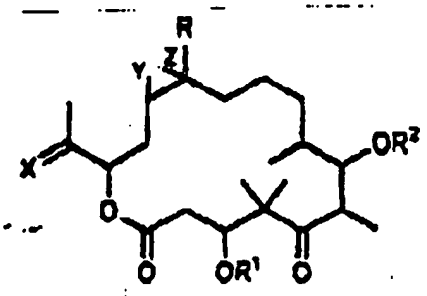
3. Epothilone derivative of formula 3



3

wherein R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_5-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and the alkyl or acyl groups contained in the residues are straight-chain or branched residues, and X stands generally for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, $-CR^1R^2-$ and $-SiR_2-$, where R, R^1 and R^2 have the same meaning as above and R^1 and R^2 together can also form an alkylene group containing 2 to 6 carbon atoms; and Y and Z have the same meanings as in Claim 1.

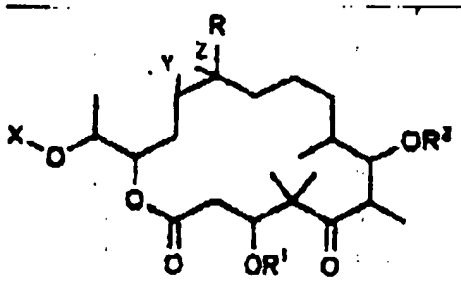
4. Epothilone derivative of formula 4



4

where R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl, hydroxy and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl or acyl groups contained in the residues are straight-chain or branched residues, X is oxygen, NOR^3, $N\text{-}NR^4R^5$, and $N\text{-}NHCONR^4R^5$, where the residues R^3 to R^5 have the above-indicated meaning, and R^4 and R^5 can, together, form an alkylene group containing 2 to 6 carbon atoms, and
Y and Z have the same meanings as in Claim 1.

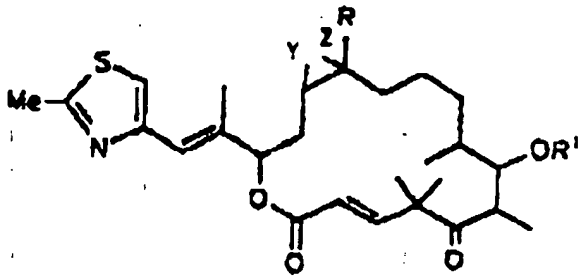
5. Epothilone derivative of formula 6



5

wherein R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benz yl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl or acyl groups contained in the residues are straight-chain or branched residues, and X is hydrogen, C_{1-18}-alkyl, C_{1-18}-acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl, and
Y and Z have the same meanings as in Claim 1.

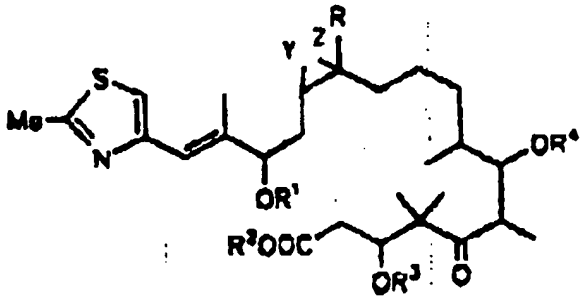
6. Epothilone derivative of formula 6



6

wherein R = H, C_{1-4}-alkyl and R^1 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl or acyl groups contained in the residues are straight-chain or branched residues; and Y and Z have the same meaning as in Claim 1.

7. Epothilone derivative of formula 7



7

wherein R = H, C_{1-4}-alkyl and R^1, R^2, R^3, R^4 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy, C_6-alkyl, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl or acyl groups contained in the residues are straight-chain or branched residues; and Y and Z have the same meanings as in Claim 1.

8. Process for the preparation of an epothilone derivative of formula 7 according to Claim 7, *characterized* in that epothilone A, epothilone B, a 3-OH-protected derivative thereof or a 7-OH-protected derivative thereof
 (a) is enzymatically hydrolyzed, particularly with an esterase or lipase; or
 (b) is hydrolyzed in alkaline medium, particularly with sodium hydroxide in a methanol/water mixture, and the epothilone derivative of formula 7 is obtained and isolated.

9. Process for th preparation of an epothilone derivative of formula 2 according to Claim 2, *characterized* in that an epothilone derivativ of f rmula 7 according to Claim 7 or as product of the process according to Claim 8 is converted into the epothilone derivative of formula 2
(a) by the Yamaguchi method, or
(b) by the Corey method, or
(c) by the Kellogg method,
and this conversion product is isolated.

10. Process for the preparation of epothilone A and/or of 12,13-bisepi-epothilone A, characterised in that epothilone C is epoxidated, in particular with dimethyldioxirane or a peracid.

11. Process for the preparation of epothilone B and/or 12,13-bisepi-epothilone B, characterised in that epothilone D is epoxidated, in particular with dimethyldioxirane or a peracid.

12. Plant-protecting agent in agriculture and forestry and/or gardening, consisting of one or more of the compounds according to one of the foregoing claims, or of one or more of these compounds plus one or more conventional carriers and/or diluents.

13. Therapeutic agent, particularly for use as a cytostatic agent, consisting of one or more of the compounds according to one or more of Claims 1 to 7, or of one or more of the compounds according to one or more of Claims 1 to 7 plus one or more conventional carriers and/or diluents.